

壳聚糖作基因载体及其改性研究进展

徐海娥, 闫翠娥*

(湖北大学化学与材料科学学院, 武汉 430062)

摘要: 基因载体是基因治疗的关键, 病毒性基因载体在临床应用上暴露出一系列安全问题, 非病毒性载体的研究成为当务之急。因其来源丰富、价廉、优良的物理化学和生物学特性, 壳聚糖是当今最具潜力的非病毒性基因载体。近年来, 壳聚糖作基因载体及其改性研究取得了长足的进展。本文重点从壳聚糖/基因复合物的尺寸、稳定性、靶向性及基因转染效率等方面概述了壳聚糖及其改性衍生物作基因载体的最新研究进展。

关键词: 壳聚糖; DNA; 非病毒性基因载体; 改性; 研究进展

基因载体能否安全有效地运载基因到指定地点决定了基因治疗在临床上应用的成败^[1]。病毒性载体已被大量应用, 但病毒载体存在自身难以克服的局限性, 如: 诱导宿主免疫反应; 装载的外源 DNA 大小有限; 可控性弱, 潜在的毒性和致癌性; 靶向性差; 制备工艺复杂, 价格昂贵等。因而毒性小、安全性高的非病毒性基因载体成为当今研究的热点。

阳离子脂质体和阳离子聚合物是目前广泛研究的两类非病毒性载体。在中性 pH 中, 其呈正电性, 易与呈负电性的 DNA 通过静电作用形成复合物。但脂质体经静脉注射后首先与血清蛋白结合, 易被单核巨噬细胞作为异物吞噬, 较难进入靶细胞, 因而其基因转染效率较病毒性载体低^[2,3], 且脂质体本身具有一定的毒性, 制备产率低, 在一定程度上限制了脂质体的应用。阳离子聚合物作为一种相对安全、高效的基因载体, 在基因治疗和生物学研究领域有着广阔的应用前景^[4,5], 一些合成的阳离子聚合物如: 聚乙烯亚胺(PEI)、聚 L-赖氨酸(PLL), 以及天然聚合物如: 胶原、壳聚糖等均是潜在的优良基因载体^[6]。

壳聚糖是天然甲壳素的脱乙酰产物, 为不多见的无生物毒性的碱性多糖, 具有优良的生物相容性和生物可降解性, 无免疫原性, 能与 DNA 形成聚电解质复合物, 其复合保护质粒 DNA 免遭 DNase 酶解的能力和基因表达水平高^[7], 通过控制复合物粒径和表面性质可控制其生理行为。此外, 可根据实际需要壳聚糖进行改性, 增加其靶向性, 提高基因转染效率。这些特性使壳聚糖成为最具潜力、安全而有效的非病毒性基因载体。本文概述了壳聚糖及其改性衍生物作基因载体的最新研究进展。

1 壳聚糖作基因载体的研究

1995 年, Mumper 等^[7]将壳聚糖溶液与细胞质粒 DNA 以一定比例混合, 制备了大小为 150~500nm 的壳聚糖/DNA 复合物, 发现壳聚糖/DNA 复合物的尺寸与所用壳聚糖的分子量有关, 与缓冲液的组成或壳聚糖的存在方式无关。复合物的尺寸对于细胞吸收相当重要, 尺寸越小的复合物越易经细胞内吞或胞饮作用进入细胞, 从而提高基因转染效率^[8]。其他研究人员也发现了类似的规律, 同时其它因素如: 壳聚糖/DNA 的配比、DNA 浓度、盐浓度、pH 值、温度等对复合物尺寸也有影响^[9]。复合物中壳聚糖与 DNA 的比例(电荷比)一般用 N/P 比(聚合物中氮的量与 DNA 中磷酸酯的量之比)表示, Erbacher 等^[9]发现 N/P 比为 2 时, 复合物接近零电位, 其尺寸在 1~5 μ m 左右。MacLaughlin 等^[10]考察了 DNA 浓度、壳聚糖分子量和 N/P 比等对所形成的壳聚糖/DNA 复合物尺寸的影响, 通过对上述因素的合理控制, 可得到 100~500nm 的复合物。Mao 等^[11]也研究了几种参数对壳聚糖/DNA 复合物尺寸的影响, 与 N/P 比的显著影响相比, 在 2.5~25mmol/L⁻¹ 范围内, 硫酸钠的浓度对所形成复合物的尺寸无影响; 在 55℃、pH 为 5.5, N/P 比为 3~

基金项目: 武汉市青年科技晨光计划(020-093403)资助项目;

作者简介: 徐海娥(1980-), 女, 高分子化学与物理专业硕士生, 主要从事生物医用高分子材料的研究;

* 通讯联系人: E-mail: yancui@yaho.com, Tel: 027-50865341; Fax: 027-88663043.

8, 制得大小为 150~250nm 的复合物; DNA 的分子量对复合物颗粒尺寸无影响。

除壳聚糖/DNA 复合物的大小外, 其稳定性、细胞毒性及转染效率也是影响其临床应用的关键因素。Mao 等发现, 在水中储存交联的壳聚糖/DNA 复合物可保持稳定三个月以上, 而在同样条件下储存在 PBS 中的未交联复合物仅能保持稳定几小时^[12]。冻干的壳聚糖/DNA 复合物可维持其转染效率达四周以上^[13]。MacLaughlin 等^[10]报道壳聚糖分子量较高时, 其与 DNA 的复合物在盐和血清中更稳定, 且 N/P 比为 2 时最稳定; 复合物在 COS-1(肾细胞)中, 无血清时, 分子量为 102KDa 的壳聚糖与 DNA 形成的复合物具有相对最高的基因表达水平, 而在 10% 的血清溶液中, 分子量为 540KDa 的壳聚糖与 DNA 形成的复合物具有相对最高的表达水平, 且表达水平随壳聚糖分子量的降低而降低; 在兔小肠内, 壳聚糖/DNA 复合物基因表达水平比裸露质粒高得多。Richardson 等^[14]制备了高纯度低聚壳聚糖及其 DNA 复合物, 发现静电作用和氢键是形成壳聚糖/DNA 复合物的重要因素; 不同低分子量的壳聚糖均无细胞毒性和溶血活性, 其细胞毒性随着壳聚糖分子量的增加而增加; 在 N/P 比为 1 时, 复合物可完全抑制 DNase II 对 DNA 的降解, 可能因壳聚糖与 DNA 复合物所形成的三维空间结构所产生的位阻影响。Sato^[15]等于不同 pH 值的血清介质中通过荧光素酶质粒(pGL-3)转染人肺癌 A549 细胞, 发现 pH 为 6.9 的转染效率比 pH 为 7.6 时高, 因为 pH 低于 7 时, 壳聚糖中的氨基被部分质子化, 壳聚糖/DNA 复合物带正电荷, 易与带负电荷的细胞结合; pH 为 6.9, N/P 比为 6.9 时的转染效率比 pH 为 7.6 时高, 5 时转染效率最高, 分子量大于 100KDa 的壳聚糖转染效率低于分子量为 15KDa 和 52KDa 的壳聚糖; 分子量为 52KDa 的壳聚糖和 pGL-3 在 N/P 比为 5 时形成的复合物在不同血清浓度下转染 A549 细胞, 发现血清含量为 20% 时, 复合物的基因表达比无血清时提高了 2~3 倍, 但血清含量为 50% 时会损害细胞, 使转染效率降低。

最近, Köping-Höggård 等^[16]制备了完全脱乙酰化单分散的壳聚糖低聚物(6, 8, 10, 12, 14-聚体)和脱乙酰度为 85% 的多分散 24-聚体壳聚糖低聚物, 发现不同壳聚糖链长、电荷比和缓冲液条件下, 噬菌体 T4 DNA/壳聚糖复合物的物理形状也不同, 如卷曲状的, 可溶球状的, 可溶聚集状的, 沉淀球状的, 沉淀聚集状的; 卷曲和球状共存的复合物不能有效介导荧光素酶在 293 细胞的体外表达, 而球状或聚集结构的复合物则有较高的表达水平; 与其它壳聚糖低聚物相比, 只有 24-聚体壳聚糖和高纯壳聚糖(UPC)能与 DNA 形成稳定的复合物, 并有效介导荧光素酶在 293 细胞的体外表达和在一种 6~8 周大小鼠的体内表达, 且 24-聚体介导的体内、外基因表达效率均高于 UPC; 因此低分子量的 24-聚体壳聚糖作基因载体比常规的高分子量壳聚糖更有优势。与分子量类似, 脱乙酰度也是影响基因转染效率的因素之一, 壳聚糖主链上的 N-乙酰基具有疏水性质, 会使壳聚糖在水溶液中发生自聚集^[17], 影响壳聚糖与 DNA 的相互作用。Leong 等^[18]制备了不同脱乙酰度(DD)的壳聚糖, 发现在血清中的基因表达随 DD 的降低而降低, 可能因低 DD 的壳聚糖/DNA 复合物稳定性较低, 但这种不稳定性却使复合物在肌肉细胞中有较高水平的基因表达。Ishii 等^[19]报道影响壳聚糖/DNA 复合物在 SOJ 细胞中转染效率的主要因素包括壳聚糖的分子量、N/P 比、血清浓度和介质的 pH 值等, 在 N/P 比为 5、质粒 DNA 浓度为 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 分子量为 40kDa 和 84kDa 的壳聚糖与 DNA 形成的复合物转染效率较高, 而分子量为 1kDa 和 110kDa 的壳聚糖与 DNA 的复合物没有发现转染, 但分子量为 1kDa 的壳聚糖与 DNA 形成的复合物很容易与细胞缔合; 分子量为 40kDa 壳聚糖与 DNA 的复合物在 N/P 比为 5 时, 随着质粒 DNA 浓度的增大, 复合物的转染效率增加; 在壳聚糖分子量为 40kDa 和 84kDa、N/P 比为 5、pH 为 7 的 10% 血清溶液, 壳聚糖/DNA 复合物具有最高的转染效率; 研究其与细胞作用机理发现, 壳聚糖/DNA 复合物可能凝聚, 从而形成一个大的聚集体吸附在细胞表面, 它还具有较高的核酸堆积作用和抑制细胞及核酸酶降解作用。

为了进一步揭示壳聚糖介导的基因转染机理, 最近, Liu 等^[20]用分子量为 5kDa、脱乙酰度 99% 的水溶性壳聚糖与 DNA 形成复合物, 壳聚糖的水溶性可保证复合物的稳定性, 高脱乙酰度可消除壳聚糖上 N-乙酰基对壳聚糖与 DNA 相互作用的影响, 研究复合物的物理化学特征发现, 与壳聚糖作用时, DNA 分子保持着 B 型构象; 壳聚糖与 DNA 的键合能力取决于介质的 pH 值; 壳聚糖与 DNA 的 N/P 比强烈影响复合物的形态, 在较低 N/P 比时, DNA 不能被完全包覆在复合物中, 在较高 N/P 比时, DNA 被完全包覆, 形成纳米尺度的球形复合物; 壳聚糖与 DNA 间特异性作用位点仍不清楚, 但 pH 值低于壳聚糖的 pKa

时,强烈的静电作用可能会阻止 DNA 从载体中的释放,从而抑制细胞核内的基因表达。

从上述一些列研究可以看出,壳聚糖的分子量及脱乙酰度、N/P 比、血清浓度和介质的 pH 值等因素对壳聚糖/DNA 复合物的大小、稳定性、转染效率都有一定程度的影响,其中壳聚糖的分子量和 N/P 比至关重要。但壳聚糖只溶于醋酸水溶液,醋酸的使用会影响某些细胞的活性;壳聚糖/DNA 复合物虽然能够转染某些细胞,但其转染效率低于市售 Lipofectin 试剂,同时壳聚糖/DNA 复合物对细胞的靶向识别能力有待提高。

近年来,许多研究表明壳聚糖能和 DNA 形成微囊,可转运治疗性基因和基因疫苗^[21~23]。Roy 等^[21]报道,壳聚糖/DNA 纳米微囊能将所需基因转移到一种对花生过敏的小鼠肠内,并在其肠道上皮诱导基因表达,有效缓解小鼠的过敏反应。潘善培等^[22]制备了壳聚糖/卵透明带 DNA 免疫微囊,在体外有效转染 HeLa 细胞,用间接免疫荧光法检测到了卵透明带特异抗原 pZP3 α DNA 在细胞内的表达。为进一步发展更安全、方便、有效的卵透明带 DNA 避孕疫苗打下了基础。刘世贵等^[23]用壳聚糖纳米颗粒包裹小鼠白细胞介素 2 基因(mIL22)真核表达质粒(VRMIL22),肌注接种 21d 昆明小鼠,观察 mIL22 基因体内表达及其对免疫应答和免疫保护的影响,发现壳聚糖纳米颗粒包裹 VRMIL22 可显著提高外源 IL22 基因体内表达水平,明显增强体液和细胞免疫水平的效应,增强对大肠杆菌的抗病力,可望作为有效的抗感染免疫调节剂。壳聚糖良好的低免疫性、生物相容性等诸多性质使其成为很有发展前途的粘膜免疫 DNA 疫苗载体。

2 作基因载体的壳聚糖改性

2.1 糖基化壳聚糖

Cho 等先将壳聚糖与乳糖酸(LA)共价连接,得到半乳糖基化壳聚糖(GC),LA 上的半乳糖配体能被肝细胞上的脱唾液酸蛋白受体(ASGR)特异性识别^[24],从而赋予对肝细胞的靶向性,然后在 GC 上接枝不同的亲水基团,制备出一系列半乳糖改性的壳聚糖衍生物/DNA 复合物,如半乳糖基化壳聚糖接枝右旋糖苷(GCD)与 DNA 的复合物(GCD/DNA)^[25],半乳糖基化壳聚糖接枝聚乙二醇(GCP)与 DNA 的复合物(GCP/DNA)^[26],半乳糖基化壳聚糖接枝聚乙烯基吡咯烷酮(GCPVP)与 DNA 的复合物(GCPVP/DNA)^[27]等。结果表明,亲水基团的接枝可防止复合物自聚集,增强其在水中的稳定性;GCD 和 GCP 与 DNA 复合物的尺寸都随 N/P 比的增加而减小,在 N/P 比为 5 左右,GCD/DNA 复合物的最小尺寸约为 200nm,GCP/DNA 复合物的最小尺寸约为 27nm,且复合物的形成对 DNA 二级结构无影响;GCP/DNA 和 GCPVP/DNA 复合物可保护 DNA 免受血清中 DNase I 的降解;GCPVP/DNA 复合物的特征主要取决于壳聚糖的分子量和 PVP 的组成,GCPVP10K/DNA 复合物的结合强度高于 GCPVP50K/DNA 的复合物,而保护 DNA 免受 DNase I 降解的能力要低一些,表明有效复合物的形成同时要求较高的结合强度和较低的聚合物分子量;体外转染研究表明,GCP 对 HepG2、Hela、和 CT-2 细胞的毒性都小到可忽略,且对有 ASGR 的 HepG2 细胞毒性更小,可能因 ASGR 介导内吞降低了 GCP 在介质中的浓度,且与 DNA 复合后电荷密度得到分散;GCD/DNA 和 GCP/DNA 复合物只转染表达有 ASGR 的 HepG2 细胞,表明细胞表面的 ASGR 和壳聚糖上的半乳糖配体间有特异性反应;血清存在时,GCP/DNA 复合物体外转染效率比无血清时要低得多,可能因 GCP/DNA 复合物部分离解。可见将柔性的亲水聚合物连接到基因载体中,会产生与蛋白质和噬菌细胞反应的空间障碍,延长载体在血浆中的循环时间^[28]。复合物的蛋白吸附、DNA 结合强度和抗酶解能力在很大程度上依赖于壳聚糖的分子量和亲水基团组成。

Gao 等^[29]将高分子量壳聚糖(HMWC)降解,所得低聚壳聚糖(LMWC)再与 LA 反应制得半乳糖化程度不同的一系列壳聚糖衍生物(Gal-LMWC)及其与 DNA 的复合物(HMWC/DNA、LMWC/DNA、Gal-LMWC/DNA),对复合物的特性和转染效率作了详尽的研究和比较。随着 LA/LMWC 摩尔比的升高,Gal-LMWC 半乳糖化程度呈线性增长趋势,当 LA/LMWC 大于 0.5,Gal-LMWC 半乳糖化程度保持不变;随着 N/P 比增加, HMWC/DNA 复合物的粒径一直增大,而 LMWC/DNA 复合物和 Gal-LMWC/DNA 复合物的粒径则分别保持在 220nm 和 350nm 左右,因而 LMWC 更适于和 DNA 形成均一、稳定的纳米复合物;尽管 HMWC 复合 DNA 的效率高于 LMWC 和 Gal-LMWC,但由于其粒径较大,不利于细胞内吞,导致 HMWC/DNA 复合物

的转染效率低于 Gal-LMWC/DNA 复合物;三种壳聚糖衍生物对 HepG2 和 Hela 细胞的毒性均小于市售的 Lipofectin 和 CaP 试剂,甚至在浓度高达 $350\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞仍生长良好,表明 Gal-LMWC 是一种安全、无毒的载体;研究 Gal-LMWC/DNA 复合物对 HepG2 细胞的转染效率发现,随着 N/P 比从 0.94/1 增大到 5.6/1,其转染效率也增加,在 N/P 比为 5.6/1 时转染效率最高,随后又呈下降趋势;在 Gal-LMWC 与 DNA 的 N/P 为 6/1 时,四种半乳糖度的改性壳聚糖都能与 DNA 形成稳定的复合物,随着壳聚糖半乳糖化程度的提高,其大小稍有增加,从 314nm 增大到 341nm;复合物的转染效率与半乳糖化程度密切相关,随着半乳糖化程度的提高而提高,表明 Gal-LMWC 通过 ASGR 介导内吞选择性转染 HepG2 细胞。壳聚糖的分子量、N/P 比、半乳糖化程度等对转染效率都有重要影响。

为了增加壳聚糖在水中的溶解性,右旋糖苷、聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮被引入壳聚糖链^[25,26,27],但其制备过程复杂,步骤繁多,耗时。为克服上述缺点,使制备过程简化,Cho 等^[30]直接用水溶性壳聚糖(WSC)与 LA 共价连接,得到半乳糖化水溶性壳聚糖载体,发现载体的表面电荷是影响其生物分布^[31]和转染效率^[32]的重要因素,GC13K/DNA 和 GC18K/DNA 复合物尺寸都随着 GC/DNA 电荷比的增加而减小,电荷比为 5 时达到最小值,分别为 240nm 和 100nm,由于很多哺乳动物细胞对内吞粒子大小限制在 150nm 内^[33],因此 GC18K/DNA 复合物更适宜作肝细胞靶向载体;在较高电荷比下,复合物表面电荷排斥阻止了 DNA 的自聚集,复合物稳定性很高,且与 DNA 结合强度也高,能有效保护 DNA 免受 DNase I 降解;细胞毒性和转染实验发现,不同浓度的 GC18K 对 HepG2 和 Hela 细胞的繁殖能力都无影响,细胞平均繁殖能力超过 100%,而用相同浓度的 PEI 作对比,两种细胞繁殖能力只有 20%~40%;GC/DNA 复合物对 HepG2 细胞的转染效率远高于 WSC/DNA 复合物,而对 Hela 细胞转染效率无差异,说明 GC 上的半乳糖配体可特异性识别 Hep G2 上的 ASGR;在半乳糖存在下,GC/DNA 对 HepG2 细胞的转染受到抑制,说明 GC/DNA 复合物是通过受体介导内吞转染的。这些研究表明,直接使用 WSC 而不连接任何亲水基团,不仅可增加壳聚糖在体液中的溶解性和稳定性,排除用醋酸作溶剂可能带来的细胞毒性,且使化学改性更容易。这种改性壳聚糖表现出很强的复合 DNA 能力且其复合物对细胞无毒,调整其电荷比可获得特定大小、稳定的复合物颗粒,特异性转染有 ASGR 的细胞。

沈健等^[34,35]设计合成了亲水性 *N*-亚甲基磷酸盐壳聚糖和 *O*-羧甲基壳聚糖,在其剩余的 2-NH₂ 上进行乳糖酰化和乳糖胺化反应,分别制得了 *N*-亚甲基磷酸-*N*-乳糖酰化壳聚糖、*N*-亚甲基磷酸-*N*-乳糖胺化壳聚糖和 *O*-羧甲基-*N*-乳糖酰化壳聚糖与 *O*-羧甲基-*N*-乳糖胺化壳聚糖,对这些壳聚糖衍生物的结构进行了表征,并对物理性质作了分析,发现亲水基团的引入可增加壳聚糖的水溶性,半乳糖基赋予了对肝细胞的靶向性,因此,这些壳聚糖衍生物有望成为潜在的肝靶向的新型基因载体。

2.2 季铵化壳聚糖

壳聚糖在生理 pH 值时不溶,pH 值大于 6 时会发生聚集,只有质子化的可溶性壳聚糖才使细胞膜形成短暂的通道,提高基因跨膜运输的效率。为了克服这一缺点,提高基因转染效率,Thanou 等^[36]用低聚壳聚糖与碘甲烷反应,合成了几种壳聚糖季铵盐(TMOs),研究了季铵度为 40%(TMO-40)和 50%(TMO-50)的两种壳聚糖与 DNA 复合的能力,及其复合物对细胞的毒性和转染效率。所合成的壳聚糖衍生物在不同 pH 值下都有良好的水溶性,壳聚糖和季铵化低聚壳聚糖与 DNA 混合后,都能自发形成复合物,质粒 DNA/低聚物之比为 2/1000(mg/mg)时形成的复合物尺寸较小,2/100 时形成的复合物尺寸较大,且在 2/100 和 2/10 时,季铵化壳聚糖与 DNA 形成的复合物颗粒都小于未改性的壳聚糖与 DNA 形成的复合物颗粒,说明季铵化改性增强了低聚壳聚糖在中性 pH 值下与 DNA 的键合作用;壳聚糖/DNA 复合物对 COS-1 和 Caco-2 细胞(上皮细胞)的毒性和转染实验表明(如表 1 所示),在 COS-1 细胞中,与裸 DNA 相比,壳聚糖低聚物可使转染效率提高 2~4 倍,季铵化低聚壳聚糖可使转染效率提高更多;壳聚糖和季铵化壳聚糖在 Caco-2 细胞中的转染效率远远低于 COS-1 细胞,比裸 DNA 的转染效率稍高,且对 COS-1 和 Caco-2 细胞均无毒性。可见,季铵化增强了低聚壳聚糖对 DNA 的复合作用,能大大提高对 COS-1 细胞的转染效率,且对细胞无毒,部分季铵化的低聚壳聚糖可作上皮细胞系的基因转移载体。

表 1 壳聚糖与季铵化壳聚糖细胞毒性及转染效率的比较
Table 1 Cytotoxicity and transfection efficiency of chitosan and quaternized chitosan

种类	细胞毒性		转染效率(相对裸 DNA)	
	COS-1	Caco-2	COS-1	Caco-2
壳聚糖	很小	很小	2~4 倍	稍高
TMO-40	很小	很小	26~131 倍	稍高
TMO-50	很小	很小	5~52 倍	稍高

Thanou^[37] 等制备了一系列低聚壳聚糖(3~6 KDa) 和低分子量壳聚糖(~100 KDa) 的季铵盐, 研究这些壳聚糖衍生物对 COS-7 和 MCF-7 细胞的毒性和转染效率发现, 三甲基化低聚壳聚糖(TMOs) 对细胞的毒性小于三甲基化低分子量壳聚糖(TMCs), 且随着季铵度增加, 所有壳聚糖衍生物对细胞的毒性均增加, 但季铵度达到 93% 时毒性减小, 由于季铵化反应时间增长使导致聚合物降解所致; 所有壳聚糖衍生物细胞毒性都比 PEI 低。TMOs 和 TMCs 都能有效转染上述两种细胞, 但对二者的转染效率有很大差异, 季铵度为 44% 的 TMO(TMO 44) 和季铵度为 57% 与 93% 的 TMC(TMC57, TMC93) 转染效率比其它季铵度的壳聚糖高; 在 MCF-7 细胞中, TMO 44 转染效率是 PEI 的 16 倍, TMC57 和 TMC93 转染效率分别是 PEI 的 23 倍和 50 倍; 而在 COS-7 细胞中, TMOs 和 TMCs 的转染效率都比 PEI 低。因此, 对于不同类型的细胞, 须选择恰当的基因载体才能取得最佳转染效果。

Murata 等^[38,39] 在三甲基壳聚糖上引入半乳糖侧链, 合成了一系列含有半乳糖的季铵化壳聚糖, 研究了这类壳聚糖衍生物/ DNA 复合物的形成条件、复合物的细胞毒性及识别能力, 发现半乳糖化程度为 5% 和 20% 的两种季铵化壳聚糖(TC-Gal5 和 TC-Gal20) 与 DNA 的复合物对 Hela 细胞的体外实验毒性很低; TC-Gal5 DNA 复合物可识别 APA(Abrus Precatorius agglutinin) 外源凝集素, 但识别能力不高; 随着半乳糖化程度的增加, TC-Gal/ DNA 复合物对 APA 外源凝集素的识别能力有所增加。为了进一步提高通过受体介导内吞的基因转染效率, Murata 等^[39] 制备了一个壳聚糖单元上连接有四条半乳糖链的季铵化壳聚糖(TC-Gal4A 20), 壳聚糖衍生物/ DNA 复合物与 RCA120(Ricinus communis agglutinin-120) 外源凝集素作用的研究发现, 不含半乳糖基的季铵化壳聚糖对 RCA120 外源凝集素表观亲合常数较低, 半乳糖化的季铵化壳聚糖(TC-Gal5 和 TC-Gal20) 对 RCA120 外源凝集素表观亲合常数较高, TC-Gal4A 20 的表观亲合常数最高, 且随半乳糖化程度的增加而增大; 研究三种半乳糖化的季铵化壳聚糖(TC-Gal5、TC-Gal20 和 TC-Gal4A20) 与 DNA 的复合物在 HepG2 细胞中表达 β -半乳糖苷酶活力的能力发现, 三种壳聚糖衍生物的 DNA 复合物都能有效转染 HepG2 细胞, 但在抑制剂存在时其转染效率下降很多, 表明复合物主要通过 HepG2 细胞表面的半乳糖受体介导内吞转染。多个无分支的半乳糖链引入壳聚糖可增强细胞靶向识别能力, 这类半乳糖化的壳聚糖衍生物可作对肝细胞靶向基因载体。

2.3 N-烷基化壳聚糖

姚康德等^[40,41] 用十二烷基溴和壳聚糖(平均分子量为 700KDa) 合成了 N-十二烷基化壳聚糖(CS-12), 并使之与 DNA 自组装形成复合物(DNA-CS-12 PEC)。AFM 观察到 PEC 呈球形结构, 每个球形复合物中含有 40~115 个 DNA 分子。测定不同温度下 DNA 和 CS-12/ DNA 的紫外吸收发现, 由于十二烷基化壳聚糖的保护作用, DNA 分子的热稳定性提高。低分子量的盐, 如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 能够使 PEC 离解, 释放出 DNA, 由于 Mg^{2+} 对 DNA 的亲合力较高, Mg^{2+} 离解 PEC 的能力大于 Na^+ 和 K^+ 。DNA 酶解实验表明, 原始 DNA 酶解成碎片, 而受十二烷基化壳聚糖保护的 DNA 不被降解, 保持完好。

2.4 酸改性壳聚糖

Lee^[42] 和 Kim 等^[43] 用脱氧胆酸对壳聚糖进行了疏水改性, 脱氧胆酸是胆汁酸的主要成分, 由于胆汁酸可在水中形成自聚体, 脱氧胆酸改性的壳聚糖也能在水中自聚集形成平均直径为 160nm 的稳定胶束; 此壳聚糖自聚体与质粒 DNA 复合, 介质的 pH 值对复合物的形成也有影响, 在 N/P 比为 4, pH 值大于 8 的复合物会发生离解, 释放出 DNA, 壳聚糖的 $\text{pK}_b=7.7$, pH 大于 8 时, 壳聚糖的氨基未质子化, 不能与

DNA 形成电荷复合物;壳聚糖自聚体 /DNA 复合物对 COS-1 细胞的体外转染效率与裸 DNA 相比有所提高,但低于市售的 Lipofectamine 试剂。

Kim 等^[44]用带咪唑环的尿刊酸(UA)改性水溶性壳聚糖(WSC),制备了 UA 取代度分别为 20%、50% 和 70% 的三种改性壳聚糖(UAC 20, UAC50 和 UAC70)。凝胶电泳实验表明,这些改性壳聚糖与 DNA 复合的能力都高于未改性的壳聚糖,复合效率随着 UA 取代度的增加而增加;UAC /DNA 复合物的尺寸随 N / P 比的增加而减小,在不同 N / P 比下,其平均粒径都在 100nm 以内,很适合输送 DNA 进入哺乳动物细胞;在 N / P 比为 5 以上,UAC /DNA 复合物表现出很强的保护 DNA 免受 DNase I 降解的能力;壳聚糖和改性壳聚糖及其与 DNA 的复合物对 293T 细胞的毒性很低,细胞繁殖能力超过 90%,由于 UA 无毒且具有生物相容性,增加尿刊酸取代度,细胞繁殖能力也增加;细胞转染研究表明,UAC /DNA 复合物对 293T 细胞转染效率比壳聚糖 /DNA 复合物提高了很多,且随 UA 取代度或 N / P 比的增加而增加;对 HeLa、MCF-7、NCTC3749 巨噬细胞体外转染实验发现,UAC /DNA 复合物只能提高 NCTC3749 巨噬细胞的转染效率,其基因转染取决于细胞类型,这种壳聚糖 /DNA 复合物的细胞依赖性已被很多研究人员证实^[9,45,46]。以上研究表明,尿刊酸的改性能增强壳聚糖与 DNA 复合的能力,且可提高巨噬细胞的基因转染效率。

以上研究大多只进行了体外细胞转染实验,Paik^[47]和 Yoo^[48]等制备了 5 β -胆烷酸疏水改性的乙二醇化壳聚糖(HGC),并成功用于动物体内、外细胞转染实验。为了与 DNA 有效复合,先将 DNA 与十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)复合使之疏水化,HGC 与 CTAB /DNA 复合物通过疏水作用自组装成纳米复合物。CTAB /DNA 的电荷比、HGC 与乙二醇化壳聚糖之比对复合物的形成、细胞毒性、转染效率等都有影响。CTAB /DNA 的电荷比在 1 以上时,大部分 DNA 都能与 CTAB 复合,且电荷比为 1 的 CTAB /DNA 复合物最稳定;随着 HGC 的含量增加,HGC 中的 5 β -胆烷酸与 CTAB /DNA 之间疏水作用增强,形成更紧密的包覆结构,复合物尺寸减小,更利于细胞内吞,共聚焦显微镜观察到 COS-1 细胞对 HGC100 复合物的吸收率远高于 HGC 20;增加 HGC 含量或 CTAB /DNA 的电荷比都会使复合物对 COS-1 细胞的毒性降低,基因转染效率增加(如图 1 所示);将 HGC 复合物注射到雌小鼠(7 周大)的左大腿,24h 后测得荧光素酶基因在组织内的表达随着 HGC 复合物中 HGC 含量的增加而增加;众所周知,裸 DNA 在肌肉组织中的基因转染效率高于其它转染试剂,但当 HGC 含量大于 80% 时,HGC 复合物的转染率超过裸 DNA 或其它市售转染试剂。因此,含大量 HGC 成分的 HGC 复合物对于提高动物体内基因转染效率有重要作用。

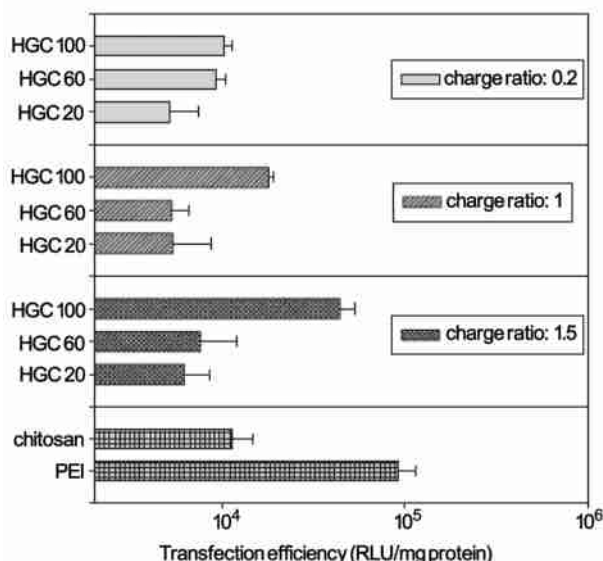


图 1 HGC 纳米粒对 COS-1 细胞的转染效率(电荷比是 CTAB 与 DNA 的电荷比)

Figure 1 Transfection efficiencies of HGC nanoparticles on COS-1 cell (Charge ratios are CTAB to DNA charge ratios.)

2.5 壳聚糖 /DNA 复合物上连接特定配体

转铁蛋白受体存在于很多哺乳动物细胞表面,它是细胞吸收铁的主要途径^[49]。作为配体,转铁蛋白

能通过受体介导内吞机理有效转运小分子药物、生物活性大分子和脂质体^[49,50]。为改善壳聚糖/DNA 复合物的表面性质,提高基因转染效率,Mao 等^[51]采用两种方法将转铁蛋白连接到壳聚糖/DNA 复合物表面。第一种通过高碘酸盐氧化,在转铁蛋白上引入醛基,改性的转铁蛋白再与壳聚糖/DNA 复合物表面的氨基反应,获得转铁蛋白取代度为 5.3%,14.2% 和 32.7% 的壳聚糖/DNA 复合物;该方法保证改性只发生在转铁蛋白的糖链上,转铁蛋白的糖链在转铁蛋白和壳聚糖/DNA 复合物表面之间提供了较长的空间臂,减小了配体-受体相互作用的空间位阻,保证转铁蛋白结合活性损失最小;转铁蛋白取代度为 14.2% 的复合物对 HEK293 细胞转染能力是壳聚糖/DNA 复合物的两倍,而取代度为 5.3% 和 32.7% 的壳聚糖/DNA 复合物转染能力几乎不变,可能是由于转铁蛋白量较大时,自身发生了键连。第二种方法通过可逆反应将转铁蛋白通过二硫键连接到壳聚糖/DNA 复合物表面,此连接了转铁蛋白的壳聚糖/DNA 复合物对 HEK293 细胞的转染效率比未改性的壳聚糖/DNA 复合物高 4 倍。这两种连接转铁蛋白配体的方法都未能显著增强壳聚糖/DNA 复合物对 HeLa 细胞的转染能力,他们^[51]又尝试了 KNOB 蛋白配体与壳聚糖/DNA 复合物的连接,采用相似的方法将 KNOB 蛋白通过二硫键连接到壳聚糖/DNA 复合物表面,KNOB 蛋白取代度为 12%-17%,与未改性的壳聚糖/DNA 复合物相比,连接了 KNOB 蛋白的复合物对 HeLa 细胞的转染效率提高了 130 倍,对 HEK293 细胞的转染效率提高了 6~7 倍。

壳聚糖/DNA 复合物在室温或 4℃ 时储存两天就会发生聚集,连接了转铁蛋白的壳聚糖/DNA 复合物在室温下可保存两周,在 4℃ 可保存几天,稳定性的提高可能缘于改性壳聚糖/DNA 复合物表面亲水性的增加。但此复合物冻干后重新悬浮在盐溶液中仍然会聚集。为了提高壳聚糖/DNA 复合物冻干稳定性,将 PEG 连接到壳聚糖/DNA 复合物表面^[51],PEG 化已用于改善基因载体的稳定性^[32,33]。结果发现,PEG 化不影响转染效率,随着 PEG 化程度的增加,基因表达水平略有增加。Leong 等^[45]制备了壳聚糖/DNA 复合物,为防止其发生聚集,用 PEG ($M_w = 5000$) 对复合物进行改性,在反应温度为 55℃、pH=5.5、 Na_2SO_4 浓度 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、壳聚糖浓度为 0.005~0.02(w/v)% 和 DNA 浓度为 0.004%~0.008% 时制得了较为理想的壳聚糖/DNA 复合物。这些复合物大小在 200~750nm,在荧光酶素 293 细胞体系中是一种很有效的载体,且不同的细胞链中其转染效果不同。为了使转铁蛋白最大程度接近细胞表面受体,使用相对长的空间臂 NHS-PEG 2000-MAL(PEG 分子量为 2000)将其连接到壳聚糖/DNA 复合物表面^[51],NHS-PEG2000-MAL 与壳聚糖氨基之比为 1:10,其转染效率比未改性的壳聚糖/DNA 复合物略高或近似,PEG 化壳聚糖/DNA 复合物冻干后在 4℃ 或 -20℃ 储存一个月以上,仍易重新溶于盐或 PBS 溶液,转染效率也未受影响,说明 PEG 的连接能够增加壳聚糖/DNA 复合物的亲水性,降低表面自由能,阻止了它在水溶液中的聚集行为和冷冻干燥后的自由聚集行为,从而增强在水溶液中的物理化学稳定性和储存稳定性;在静脉注射 15min 后,壳聚糖/DNA 复合物和 PEG 化的壳聚糖/DNA 复合物在肾和肝中有较高的沉积,到一小时后基本无差别,壳聚糖/DNA 复合物的表面 PEG 化使其清除速度稍慢于未改性的壳聚糖/DNA 复合物。

这些研究结果表明,在壳聚糖/DNA 复合物表面连接一定的配体,可提高其对细胞的靶向性和基因转染效率,且通过壳聚糖/DNA 复合物表面改性可提高其稳定性。

3 结束语

壳聚糖由于其优良的物理化学及生物学特性,在药物研究领域得到了广泛的应用,尤其是壳聚糖及其衍生物作基因载体已成为前沿的研究课题。我国对壳聚糖用作其它药物缓释载体的研究较多,但对于壳聚糖作基因载体的研究较少。近年来,国内科研工作者已加快在此领域的研究步伐,如刘文广^[29],潘善培^[23],刘世贵^[23],沈健^[34,35],张峻峰^[29],姚康德^[40,41],常津^[51]和梁文权等^[51],以壳聚糖作不同种类 DNA 的载体,探讨其复合物对不同细胞的基因转染机理,及如何改性以提高其靶向识别性和热稳定性等,并取得了一定成果。

壳聚糖是一种具有广阔应用前景的基因治疗载体,也是最有希望实现产业化的一种载体。尽管对壳聚糖及其改性衍生物作基因载体的研究取得了可喜的进展,但存在的问题也不容忽视,如壳聚糖及其衍生物对不同细胞的基因转染效率差别很大,不可预测;基因转染机制、动力学等尚不完全清楚,且大部分

实验仅限于体外,体内研究有待进一步系统、深入。因此,如何标记、可视跟踪壳聚糖/DNA 复合物进入不同细胞的过程,明确其基因转染机制,提高基因转染效率,使其尽快进入基因治疗临床应用是近年的主要研究方向。最近,以水溶性量子点作荧光探针特异性标记生物分子、细胞及整个动物体,在生物、医学多色成像方面取得了重大进展^[56],以水溶性量子点标记壳聚糖/DNA 复合物与不同细胞的相互作用过程,应是一种简洁有效的揭示其基因转染机制的方法。

参考文献:

- [1] Borchard G. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52: 145~150.
- [2] Liu F, Huang L. *J Control Rel*, 2002, 17(78): 259~266
- [3] Song Y K, Liu D. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1372(1): 141~150.
- [4] Smedt S C De, Demeester J, Hermink W E. *Pharm Res*, 2000, 17: 113~126.
- [5] Garnett M C. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1999, 16: 147~207.
- [6] 王勤, 龚跃法, 杨祥良. *广东药学院学报*, 2004(1): 62~64.
- [7] Mumper R J, Wang J J, Caspell J M, et al. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1995, 22: 178~179.
- [8] Illum L, Jabbar-Gill I, Hinchcliffe M, et al. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 51: 81~96.
- [9] Erbacher P, Zou S, Bettinger T, et al. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1332~1339.
- [10] MacLaughlin F C, Mumper R J, Wang J, et al. *J Control Rel*, 1998, 56: 259~272.
- [11] Mao H Q, Roy K, Walsh S M, et al. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, Kyoto, Japan, 1996, 23: 401~402.
- [12] Leong K W, Mao H Q, Roy K, et al. *J Control Rel*, 1998, 53: 183~193.
- [13] Mao H Q, Roy K, Truong-Le V L, et al. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, Stockholm, Sweden, 1997, 24: 671~672.
- [14] Richardson S C W, Kolbe V J H, Duncan R. *Int J Pharm*, 1999, 178: 231~243.
- [15] Sato T, Ishii T, Okahata Y. *Biomaterials*, 2001, 22: 2075~2080.
- [16] Köping-Höggård M, Melnikova Y S, Värn K M, et al. *J Gene Med*, 2003, 5: 130~141.
- [17] Philippova O E, Volkov E V, Sitnikova N L, et al. *Biomacromolecules*, 2001, 2: 483~490.
- [18] Kiang T, Wen J, Lim H W, Leong K W. *Biomaterials*, 2004, 25: 5293~5301.
- [19] Ishii T, Okahata Y, Sato T. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514(1): 51~64.
- [20] Liu W G, Sun S J, Yao K D, et al. *Biomaterials*, 2005, 26: 2705~2711.
- [21] Roy K, Mao H Q, Huang S K, et al. *Nat Med*, 1999, 5(4): 387~391.
- [22] 孙彩军, 潘善培, 王彬, 等. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2004, 25(1): 102~109.
- [23] 李惠, 高荣, 刘世贵, 等. *生物医学工程学杂志*, 2004, 21(6): 947~952.
- [24] Ashwell G, Morell A. *Adv Enzymol*, 1974, 41: 99~128.
- [25] Park I K, Park Y H, Cho C S, et al. *J Control Rel*, 2000, 69: 97~108.
- [26] Park I K, Kim T H, Cho C S, et al. *J Control Rel*, 2001, 76: 349~362.
- [27] Park I K, Ihn J E, Cho C S, et al. *J Control Rel*, 2003, 86: 349~359.
- [28] Allen T M. *Trends Pharmacol Sci*, 1994, 15: 215~220.
- [29] Gao S, Chen J, Xu X, Ding Z, et al. *Int J Pharm*, 2003, 255: 57~68.
- [30] Kim T H, Park I K, Cho C S, et al. *Biomaterials*, 2004, 25: 3783~3792.
- [31] Mahato R I, Akakura Y, Hashida M. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 1997, 14: 133~172.
- [32] Nomura T, Nakajima S, Kawabata K, et al. *Cancer Res*, 1997, 57: 2681~2686.
- [33] Seymour L W. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 1992(9): 135~187.
- [34] 张灿, 丁娅, 杨波, 沈健. *中国天然药物*, 2004, 2(2): 94~98.
- [35] 张宏娟, 丁娅, 张灿, 沈健. *中国天然药物*, 2004, 2(6): 354~358.
- [36] Thanou M, Florea B I, Geldof M, Junginger H E, et al. *Biomaterials*, 2002, 23: 153~159.
- [37] Kean T, Roth S, Thanou M. *J Control Rel*, 2005, 103: 643~653.
- [38] Murata J-I, Ohya Y, Ouchi T. *Carbohydr Polym*, 1996, 29: 69~74.
- [39] Murata J-I, Ohya Y, Ouchi T. *Carbohydr Polym*, 1997, 32: 105~119.
- [40] Liu W G, Yao K D, Liu Q G. *J Appl Poly Sci*, 2001, 82: 3391~3395.
- [41] Li F, Liu W G, Yao K D. *Biomaterials*, 2002, 23: 343~347.
- [42] Lee K Y, Kwon I C, Kim Y H, Jo W H, et al. *J Control Rel*, 1998, 51: 213~220.
- [43] Kim Y H, Gilm S H, Park C R. *Bioconjug Chem*, 2001, 12: 932~938.

[44] Kim T H, Ihm J E, Choi Y J, et al. J Control Rel, 2003, 93: 389 ~ 402

[45] Leong K W, Mao H Q, Truong-Le V L, et al. J Control Rel, 1998, 53: 183 ~ 193

[46] Corsi K, Chellat F, Yahia L, et al. Biomaterials, 2003, 24: 1255 ~ 1264.

[47] Park J H, Kwon S, Jeong S Y, et al. J Control Rel, 2004, 95: 579 ~ 588

[48] Yoo H S, Lee J E, Jeong S Y, et al. J Control Rel, 2005, 103: 235 ~ 243

[49] Dautry-Varsat A. Biochimie, 1986, 68(3): 375 ~ 381

[50] Deshpande D, Toledo-Velasquez D, Wang L Y, et al. Pham Res, 1994, 11(8): 1121 ~ 1126.

[51] Mao H Q, Roy K, Truong-Le V L, et al. J Control Rel, 2001, 70: 399 ~ 421.

[52] Wheeler J J, Palmer L, Ossanlou M, et al. Gene Ther, 1999, 6(2): 271 ~ 281.

[53] Ogris M, Brunner S, Schuller S, et al. Gene Ther, 1999, 6(4): 595 ~ 605.

[54] 常津, 刘海峰, 许晓秋, 等. 中国生物医学工程学报, 2002, 21(6): 515 ~ 529.

[55] 魏晓红, 梁文权, 潘远江. 高等学校化学学报, 2003, 24(11): 1993 ~ 1996.

[56] Jasmina L, Hassan S B, Yan C E, et al. J Molecular Medicine, 2005, 83(5): 377 ~ 385

Recent Progress in Chitosan and its Modification for Gene Delivery

XU Hai-e, YAN Cui-e

(Faculty of Chemistry and Material Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Gene vectors are of great importance in gene therapy. Non-viral gene vectors gain most attention as viral gene vectors have shown a series of safety problems during clinical application. Chitosan is one of the best potential non-viral gene vectors because of its excellent physico-chemical and biological properties. In recent years, a lot of works have been done on chitosan and its modification for gene delivery, and valuable progresses have been achieved. In this paper, recent progress in chitosan and its modification for gene delivery are reviewed in detail in terms of size, stability, specific targeting ability and transfection efficiency of chitosan /DNA complex for different cells.

Key words: Chitosan; DNA; Non-viral gene vectors; Modification; Progress